文章编号: 1001-4721 (2013)01-0003-04

# 梅花鹿生茸区骨膜细胞基因片段测序分析

鲁晓萍, 孙红梅, 褚文辉, 王大涛, 赵海平, 李春义\*

(中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学省部共建国家重点实验室、长春 130112)

摘要:在已经构建的梅花鹿生茸区骨膜细胞 cDNA 表达文库的基础上对文库中的噬菌斑进行随机挑取筛选,对筛选出来的噬菌斑进行质粒亚克隆、鉴定及表达序列标签序列测定和生物信息学分析。通过随机筛选及生物信息学分析的方法发现,在梅花鹿生茸区骨膜细胞中有特殊意义的基因或者基因片段。随机挑选表达频率比较高的 11 个基因片段中有 6 个基因片段具有重要意义,对这 6 个基因片段进行了生物信息学分析,为进一步的鹿茸生物学研究打下了基础。

关键词: 鹿茸; 生茸区骨膜; 表达序列标签序列; cDNA 文库; 基因克隆

中图分类号: Q785 文献标识码: A

# Analysis of EST Sequences of Antlerogenic Periosteum Cells in Sika Deer

LU Xiao—ping, SUN Hong—mei, CHU Wen—hui, WANG Da—tao, ZHAO Hai—ping, LI Chun—yi \*\*

(State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economical Animals, Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China)

**Abstract:** This research based on the constructed cDNA Library of antlerogenic periosteal cells of sika deer. In order to identify isolate important genes or gene fragments through random selection, we picked some of the bacteriophage plaques from the library, after that we sub—cloned them and analysed their EST sequences. The results demonstrated that six out of the eleven gene fragments may play important role in deer antler biology.

Key words; deer antler; antlerogenic periosteum; EST sequences; cDNA library; gene clone

鹿茸是已知哺乳动物中唯一能够在失去后还能完全再生的器官。研究证明鹿生茸区骨膜是鹿茸发生和再生的组织基础。Li 等对该骨膜及鹿茸的发育进行了大量的研究,这些研究证实该骨膜具有极强的自我分化能力,是鹿茸发生的干细胞组织[1,2]。鹿茸的发生是由干细胞组织介导与外表皮相互作用的过程<sup>[3]</sup>,在激素和一些其他小分子调控作用下<sup>[4]</sup>,促使了组织发生和器官发生。但是,目前调控梅花鹿生茸骨膜干细胞的小分子物质还未能够得到有效的分离,小分子物质的分离还处于初步研究过程中,

我们还无法知道都有哪些基因参与表达了这些小分子物质。目前,表达序列标签(Expressed sequence tag, EST)序列测定分析的随机筛选方法能够为处于初期研究的小分子物质分离提供线索和基础。EST序列是基因表达的短 dDNA 序列,它们携带着完整基因某些片段的信息<sup>[3]</sup>,通常包含了基因足够的结构信息区,从而与其它基因相区分。大规模随机选取克隆进行表达序列标签测序分析,将直接发现在某个重要生理过程或疾病中具有重要功能的新基因或侯选基因,获得基因组中与生物学、医学和生物制

收稿日期: 2012-12-03

基金项目: 973 前期研究专项(2011CB111515); 国家自然科学基金(31070878); 吉林省自然科学基金(20101575)

作者简介: 鲁晓萍(1981-), 女, 山东省临沂人, 研究实习员, 硕士, 从事鹿茸生物学研究。

<sup>※</sup>通讯作者: 李春义, E─ mail: chunyi. li@agresearch. ∞. nz.

药等关系最密切的信息。本研究在已构建的梅花鹿生茸区骨膜细胞 cDNA 表达文库的基础上<sup>6</sup>,对表达文库中的噬菌斑进行了随机挑取筛选,对筛选出来的噬菌斑进行进一步亚克隆、鉴定及 EST 序列测定和分析,目的是通过随机筛选的方法找到在梅花鹿生茸区骨膜细胞中有特殊意义的基因或者基因片段,从而揭示鹿茸发生和再生的机制。

# 1 材料与方法

# 1.1 cDNA 表达文库与菌株

梅花鹿生茸区骨膜细胞 dDNA 表达文库及 E. coli BM 25.8、DH 5α、BL21 (DE3)pLysE 等菌株均由中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学省部共建国家重点实验室保存。

#### 1.2 主要试剂

TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit、IPTG (TaKaRa 公司); 麦芽糖、抗生素 (Amreso 公司); TaqDNA 聚合酶、DNA Maker、PCR 试剂(大连宝生物工程有限公司); SM 液 (20mL 5M NaCl, 10mL 1mol/L MgSO4, 50mL 1mol/L MTris—HCl pH 7.5,5mL 2%明胶)、LB 培养液(中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学省部共建国家重点实验室配制)。

#### 1.3 DH 5α 感受态细菌的制备

接种复苏菌株 DH  $5\alpha$  于含有 LB 培养基的平板上, 挑取单菌落于 LB 培养液中培养, 取处于对数生长早、中期的细菌培养至  $OD_{600}$ 为 0.6,取所培养细菌冰浴, 然后加入冰冷的  $CaCl_2$  溶液冰浴 45min,离心, 加入冰冷的  $CaCl_2$  溶液重悬菌体沉淀, 加入 $7\% \sim 8\%$ 的二甲基亚砜于-70  $^{\circ}$ C保存备用。

#### 1.4 铺平板进行噬菌斑随机挑选

用 SM 液稀释所构建的 cDNA 文库至 2× 10<sup>t</sup> pfu/100<sup>t</sup>L。100<sup>t</sup>l cDNA 文库与 200<sup>t</sup>L 新培养的 BL21(DE3)pLysE 混合, 37 <sup>C</sup>静置培养 30min, 使噬菌

体感染细菌,将感染过的混合物倒于 2 XYT 平板表面,倒置培养至噬斑为0.5~lmm,随机挑选噬菌斑,过夜洗脱,扩增随机挑取的噬菌斑,进行亚克隆。

# 1.5 cDNA 噬菌体文库向 cDNA 质粒文库的亚克隆

参照文献方法<sup>7]</sup> 制备 E. oli BM 25.8 感受态,将宿主菌 E. coli BM 25.8 在 LB 培养液中过夜振摇培养。将 100世 随机挑选的噬菌体稀释液(通常为1:50到1:500)与 100世 宿主菌混合,将混合物静置培养,挑取菌落液体培养扩增,涂布菌落,过夜培养,挑单菌落,提取质粒。

#### 1.6 亚克隆质粒的提取和转化

亚克隆质粒提取按照 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit 说明书进行操作, 提取完质粒进行电泳和 PCR 鉴定。将鉴定完毕的质粒转化到感受态细菌 DH 5%。恢复 DH 5%的抗药性,涂平板, 挑单菌落, 摇菌过夜培养。将梅花鹿生茸区骨膜细胞 cDNA表达文库中随机测序的 11 个基因片段分别命名为APU1、APU2、APU3、APU4、APU5,AP1、AP2、AP3、AP4、AP5、AP6。

# 1.7 菌液的 PCR 扩增鉴定

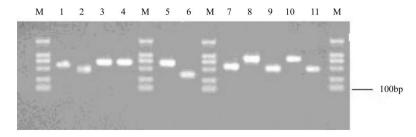
设计引物:上游 5<sup>'</sup>—GCACCATCATCATCATCAT —3<sup>'</sup> 下游5<sup>'</sup>—GCTACTTATTGCTCAGCGG —3<sup>'</sup>

(T7 terminator primer)

PCR 反应体系: 菌液 4<sup>μ</sup>L, 上下游引物各 1<sup>μ</sup>L, dNTP mix 4<sup>μ</sup>L, T aq DNA 聚 合酶 (1.25U) 0.2<sup>μ</sup>L, 10× buffer 5<sup>μ</sup>L, 灭菌去离子水 34 8<sup>μ</sup>L, 体积为 50<sup>μ</sup>L。PCR 反应程序为: 94 <sup>©</sup>预变性 3min, 94 <sup>©</sup>变性 1min, 58 <sup>©</sup>退火 1min, 72 <sup>©</sup>延伸 2min, 循环 35 次; 72 <sup>©</sup>延伸 6min。扩增完成后, 取 PCR 产物 5<sup>μ</sup>L, 1.0%琼脂糖凝胶 (含 10<sup>μ</sup>g/mL 溴化乙锭)电泳检测。检测完成将菌液送测序公司测序, 获得基因序列, 进行基因分析。

#### 2 结果

#### 2.1 菌液 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳



注, M. Maker 2 000; 泳道序列从 1 到 11 分别代表序列 AP1、AP2、AP3、AP4、AP5、AP6、APU1、APU2、APU3、APU4、APU5

Note M. stands Maker 2 000; The Electrophoresis channels stand; AP1、AP2、AP3、AP4、AP5、AP6、APU1、APU2、APU3、APU4、APU5

图 1 菌液 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of PCR products of DH 5x

#### 2 2 所测 11 个 EST 片段中 AP1~AP6 的核苷酸序列

	20	30	40	50	60	70	80	90	
TACGGACGACGA AATCTACAATCCATG ACCCTCCCCCACC AAGATAGATTTATAG ATAATGATATTTT TACAATGTAATTTAA CTCCGATCGCTGTGG AGCTGTGGCCTGGCA	TGGTCACAAG CAATGCTGTT GCTTAATTCT TACGTAATTA ACTTACAGCA TTCTTATTAT	GATATCTGGC FGTATAAGTT FGGCCAGGCA AGAGTTCACT FTTTTACTGT CAAAATTAAG	AAAGGAAACI TTGCTTATT GAAACTTCAI GTAGTGGCT GTATAATAT TTTACTTGT	CAAGCTGCTT FCTGTTTTCG GATGAAAAAA FTCATTTAAT GGTGTCCTCT ATACGGAACA	CTTGACATTA TGCTTCAGTT TTTGCATCTT ATGGCTGTCT GTGCCAGTTT ACCACAAGAA	GATGTAGCAT CGTCCAGTGC CAGTATACTT GGGAGGCACA TGTACCTTAT ATTTGATTCT	GTCTACTTTTA TCTCTGCTTGA TCTAAAGGGCA GGGTTCTCTG( AATAGAGGCA(	AAGGTC AATGGC AATCAG GCCCTG GATTGC	90 180 270 350 450 540 630 700
10	20	30	40	50 Liiii	60	70	80	90	
GGGTACGACGACGA( AGCAGGGACCTCCT(									90
CTTATATGTATGGT									180 270
TTGGGGGAAAAAAA									360
GACACATAAACTGA									450
ATAATGAGTGTGAA									540
TCTTCCATGTTTGGA	AGATATCTTTG	TATACAACAC	ACTTGTTGT	GATTCCGTCT	rgaageteaet	TATGATGTCAC	ACAGAGAAGC	AATGC	630
AGCAGACTGTCAGA(	GCGAGGAGTGA	GGCCAGCCTG	GACTCAAAGO	CCTGAGTGTG	CAAGAGCCAT	TGTGAGTGCCT	CTGTGGCTTA	ACTGC	720
CCGAGAGGTGATAA	CACAGAGCCTC	GTAGG							750
10	20	30	40	50	60	70	80	90	
CGACGACGACGACAC	CCCATCCCCA	TATCCCATCC	CAATTCAACC	ATTEMPORT	TACAACTCAC	CATCAAAACCA	cevenance	rere	90
TTCTAGTTTATCTC									180
CATTTACATGATACA									270
TGTACCTAGGCTCTT									360
GCCTGCTACTTATTA									450
CCTGCTGAACTTGTT	TAAAATGCAGA	TTCTTGTGCA	GTAGGTGGGA	ATGGCGCCTGA	AGGGCATTTCT	FAACCAGCTTG	ACGGGGCAGCT	CCCA	540
CCTCCCGGACTGCAT	TCCAAATGGC	TGGGCTCAGA	AAACTCTCCT	CCAAAGTGG	GAGAAATCCTG	GGAGGGCCTGA	TCAAGAAGAG	CCCT	630
AACCGGCCATACTG	AGCCTCCATC	CCCAA							660
10 LL	20	30	40 LL	50 	60 111111111111111111111111111111111111	70	80 LLL	90	
TACGACGACGACGA	CAGGCCATGG(	GATATOGGA	CCGAATTCT	GCTAGCTATA	GGAAAAACTA	GCAACTTGTC	CCTCTAGACC	TTGAA	90
ATGAAAGTTGCTTA	CAAAAAAGTT								,0
		ATGAAAACAA	AGCAGAGTGG	CAGCTCAGAC	CATTCTATGG	TTCTAGACTTA	ACAACAATCTT		180
CACATTAAAATGGG								TTTCT	
CACATTAAAATGGG ACCCTCCTTTACAA	ATTGGATCTC	ACCCATTATC	FATCCATCAT	CATTGTTATO	TATCCCCCAT	CACCCACTGC	CTGTCTAACCC	TTTCT CCACC	180
	ATTGGATCTCA ACATGGGAAGA	ACCCATTATC ATACATGTGT(	FATCCATCAT GCTGGGCTAA	CATTGTTATO GCTGCTTCAG	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG	CACCCACTGC( CCCTTTGCGA(	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT	TTTCT CCACC GTAGC	180 270
ACCCTCCTTTACAA	ATTGGATCTCA ACATGGGAAGA GTCTGTGGCA	ACCCATTATC: ATACATGTGT( FTTTCCAGGC	FATCCATCAT GCTGGGCTAA AAGAATACTG	CATTGTTATO GCTGCTTCAG GAGTGGATTG	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCCTT	CACCCACTGC( CCCTTTGCGA( TTCCAGGGGAT	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CCTTCTGGAGT	TTTCT CCACC GTAGC CAGGG	180 270 360
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT	ATTGGATCTCA ACATGGGAAGA GTCTGTGGCA TCTTATGTCT(	ACCCATTATO ATACATGTGT( PTTTCCAGGCA CCTGCATGGCA	PATCCATCAT GCTGGGCTAA AAGAATACTG AGGTGGGTTC	CATTGTTATO GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TTTACACTAG	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCCTT CACCACCTTT	CACCCACTGC CCCTTTGCGA TTCCAGGGGAT TATACCCAGAT	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CCTTCTGGAGT FAATCACGATG	TTTCT CCACC GTAGC CAGGG GTGTG	180 270 360 450
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACGTC	ATTGGATCTCA ACATGGGAAGA GTCTGTGGCA TCTTATGTCT GCCAGACATC	ACCCATTATO ATACATGTGT FTTTCCAGGC CCTGCATGGC CTGGAACGTG	FATCCATCAT GCTGGGCTAA AAGAATACTG AGGTGGGTTC AAGTCAAGGG	CATTGTTATO GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TTTACACTAG GGCCTTAGGA	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCCTT CACCACCTTT AGCATCACTA	CACCCACTGC CCCTTTGCGA TTCCAGGGGAT TATACCCAGAT TGAATAAAGCT	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CCTTCTGGAGT FAATCACGATG FAGTGGAAGTG	TTTCT CCACC GTAGC CAGGG GTGTG ATGGA	180 270 360 450 540
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACGTC CTCACTCACCTAGA	ATTGGATCTCA ACATGGGAAGA GTCTGTGGCA TCTTATGTCT( GCCAGACATC( ATTTCAAATC(	ACCCATTATO ATACATGTGTO FITTCCAGGCA CCTGCATGGCA CTGGAACGTGA CTAAAAGATGA	FATCCATCAT GCTGGGCTAA AAGAATACTG AGGTGGGTTC AAGTCAAGGG	CATTGTTATO GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TTTACACTAG GGCCTTAGGA	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCCTT CACCACCTTT AGCATCACTA	CACCCACTGC CCCTTTGCGA TTCCAGGGGAT TATACCCAGAT TGAATAAAGCT	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CCTTCTGGAGT FAATCACGATG FAGTGGAAGTG	TTTCT CCACC GTAGC CAGGG GTGTG ATGGA	180 270 360 450 540 630
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACGTC CTCACTCACCTAGA ATTCCAGCTGAGCT	ATTGGATCTCA ACATGGGAAGA GTCTGTGGCA TCTTATGTCT GCCAGACATCC ATTTCAAATCC ATGGTCAGGT	ACCCATTATO ATACATGTGTI ITITCCAGGCI CCTGCATGGCI CTGGAACGTGI CTAAAAGATGI ITCATT 30	PATCCATCAT GCTGGGCTAA AAGAATACTG AGGTGGGTTC AAGTCAAGGG ATTCTGTGCA 40	CATTGTTATO GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TTTACACTAG GGCCTTAGGA AGTGCTACAC	TATCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCCTT CACCACCTTT AGCATCACTA TCAATATGCC	CACCCACTGC CCCTTTGCGA TTCCAGGGGAT TATACCCAGAT TGAATAAAGCT	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CCTTCTGGAGT FAATCACGATG FAGTGGAAGTG	TTTCT CCACC GTAGC CAGGG GTGTG ATGGA	180 270 360 450 540 630 720
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACGTC CTCACTCACCTAGA ATTCCAGCTGAGCT CCACAGGACTGGAA	ATTGGATCTCA ACATGGAAGA GTCTGTGGCA TCTTATGTCTC GCCAGACATCC ATTTCAAATCC ATGGTCAGGT  20	ACCCATTATC' ATACATGTGT( PTTTCCAGGC) CCTGCATGGC CTGGAACGTG CTAAAAGATG PTCATT  30	TATCCATCAT GCTGGGCTAA AAGAATACTG AAGATACTG AAGTCAAGGGTTC AAGTCAAGGG ATTCTGTGCA	CATTGTTATC GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TTTACACTAG GGCCTTAGGA AGTGCTACAC	TATCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCCTT CACCACCTTT AGCATCACTA TCAATATGCC	CACCCACTGC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TATACCCAGAT TGAATAAAGCT AGCAAATTTGC	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CCTTCTGGAGT FAATCACGATG FAGTGGAAGTG GAAAACTCAGC	TTTCT CCACC GTAGC CAGGG GTGTG ATGGA AGTGG	180 270 360 450 540 630 720 750
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACCTC CTCACTCACCTAGA ATTCCAGCTGAGCT CCACAGGACTGGAA  10 TAGATCTTGGGTACC	ATTGGATCTCA ACATGGGAAGA GTCTGTGGCA TCTTATGTCT GCCAGACATC ATTTCAAATC ATGGTCAGGT  20 JACGACGACGACAG	ACCCATTATC' ATACATGTGTI FTTTCCAGGC, CCTGCATGGC, CTGGAACGTG, CTAAAAGATG, FTCATT  30	TATCCATCAT GCTGGGCTAA AAGAATACTG AGGTGGGTTC AAGTCAAGGG ATTCTGTGCA  40 GCGATATCGC	CATTGTTATC GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TTTACACTAG GGCCTTAGGA AGTGCTACAC  50  CATCCGAATT	TATCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCCTT CACCACCTTT AGCATCACTA TCAATATGCC	CACCCACTGCC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TATACCCAGAT TGAATAAAGCT AGCAAATTTGC	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CCTTCTGGAGT FAATCACGATG FAGTGGAAGTG GAAAACTCAGC  80	TTTCT CCACC GTAGC CAGGG GTGTG ATGGA AGTGG	180 270 360 450 540 630 720 750
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACCTTC CTCACTCACCTAGA ATTCCAGCTGAGCT CCACAGGACTGGAA  10 TAGATCTTGGGTACC GGGGTTCAAAAATAA	ATTGGATCTCA ACATGGGAAGA GTCTGTGGCA TCTTATGTCT GCCAGACATC ATTTCAAATC ATGGTCAGGT  20  GACGACGACGA	ACCCATTATO: ATACATGTGTI TTTTCCAGGC. CTGCATGGC. CTGGAACGTG. CTAAAAGATG. TTCATT  30  CAAGGCCATG	TATCCATCAT GCTGGGCTAA AAGAATACTG AAGTCAAGGG ATTCTGTGCA  40 GCGATATCGC TCCCAAACAT	CATTGTTATC GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TTTACACTAG GGCCTTAGGA AGTGCTACAC  50 GATCCGAATT	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCCTT CACCACCTTT AGCATCACTA TCAATATGCC  CAAGCCCTTCC CTCCGCCACTC	CACCCACTGCC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TATACCCAGAT TGAATAAAGCT AGCAAATTTGC  70  1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CCTTCTGGAGT FAATCACGATG FAGTGGAAGTG GAAAACTCAGC  80	TTTCT CCACC GTAGC CAGGG GTGTG ATGGA AGTGG  90 ACACA	180 270 360 450 540 630 720 750
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACGTC CTCACTCACCTAGA ATTCCAGCTGAGCT CCACAGGACTGGACT	ATTGGATCTC/ ACATGGAAG/ GTCTGTGGCA' TCTTATGTCTC GCCAGACATC ATTTCAAATC ATGGTCAGGT  GACGACGACGA AAAATTTCTTT AGGGTCAGGC	ACCCATTATO: ATACATGTGTI TTTTCCAGGC. CTGCATGGC. CTGCAACGTG. CTAAAAGATG. TCATT  30	TATCCATCAT GCTGGGCTAA AAGAATACTG AAGTCAAGGG ATTCTGTGCA  40  GCGATATCG TCCCAAACAT	CATTGTTATC GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TTTACACTAG GGCCTTAGGA AGTGCTACAC  50  GATCCGAATT TTTACCCCAGG GAAGGCGGGG	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCCTTT CACCACCTTT AGCATCACTA TCAATATGCC  CAAGCCCTTCC CTCCGCCACTCC	CACCCACTGC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TATACCCAGAT TGAATAAAGCT AGCAAATTTGC  70 LLLLLLCTTTAATCTTA GCAACCATCCC CGAGCTGGTGC	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CATTCTGGAGT FAATCACGATG FAGTGGAAGTG GAAAACTCAGC  80  AGCAAAAGAG CTTCCTGCCCC CGGGCTCTTTC	TTTCT CCACC GTAGC CAGGG GTGTG ATGGA AGTGG  90 ACACA	180 270 360 450 540 630 720 750
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACCTTC CTCACTCACCTAGA ATTCCAGCTGAGCT CCACAGGACTGGAA  10 TAGATCTTGGGTACC GGGGTTCAAAAATAA	ATTGGATCTC/ ACATGGAAG/ GTCTGTGGCA' TCTTATGTCTC GCCAGACATC ATTTCAAATC ATGGTCAGGT  GACGACGACGA AAAATTTCTTT AGGGTCAGGC	ACCCATTATO: ATACATGTGTI TTTTCCAGGC. CTGCATGGC. CTGCAACGTG. CTAAAAGATG. TCATT  30	TATCCATCAT GCTGGGCTAA AAGAATACTG AAGTCAAGGG ATTCTGTGCA  40  GCGATATCG TCCCAAACAT	CATTGTTATC GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TTTACACTAG GGCCTTAGGA AGTGCTACAC  50 GATCCGAATT TTTACCCCAGG GAAGGCGGGG	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCCTTT CACCACCTTT AGCATCACTA TCAATATGCC  CAAGCCCTTCC CTCCGCCACTCC	CACCCACTGC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TATACCCAGAT TGAATAAAGCT AGCAAATTTGC  70 LLLLLLCTTTAATCTTA GCAACCATCCC CGAGCTGGTGC	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CATTCTGGAGT FAATCACGATG FAGTGGAAGTG GAAAACTCAGC  80  AGCAAAAGAG CTTCCTGCCCC CGGGCTCTTTC	TTTCT CCACC GTAGC CAGGG GTGTG ATGGA AGTGG  90 ACACA	180 270 360 450 540 630 720 750
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACGTC CTCACTCACCTAGA ATTCCAGCTGAGCT CCACAGGACTGGACT	ATTGGATCTC/ ACATGGAAG/ GTCTGTGGCA' TCTTATGTCTC GCCAGACATC ATTTCAAATC ATGGTCAGGT  GACGACGACGA AAAATTTCTTT AGGGTCAGGC	ACCCATTATO: ATACATGTGTI TTTTCCAGGC. CTGCATGGC. CTGCAACGTG. CTAAAAGATG. TCATT  30	TATCCATCAT GCTGGGCTAA AAGAATACTG AAGTCAAGGG ATTCTGTGCA  40  GCGATATCG TCCCAAACAT	CATTGTTATC GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TTTACACTAG GGCCTTAGGA AGTGCTACAC  50 GATCCGAATT TTTACCCCAGG GAAGGCGGGG	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCCTTT CACCACCTTT AGCATCACTA TCAATATGCC  CAAGCCCTTCC CTCCGCCACTCC	CACCCACTGC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TATACCCAGAT TGAATAAAGCT AGCAAATTTGC  70 LLLLLLCTTTAATCTTA GCAACCATCCC CGAGCTGGTGC	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CATTCTGGAGT FAATCACGATG FAGTGGAAGTG GAAAACTCAGC  80  AGCAAAAGAG CTTCCTGCCCC CGGGCTCTTTC	TTTCT CCACC GTAGC CAGGG GTGTG ATGGA AGTGG  90 ACACA	180 270 360 450 540 630 720 750
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACCTC CTCACCTAGA ATTCCAGCTGAGCT CCACAGGACTGGAA  10 TAGATCTTGGGTACL GGGGTTCAAAAATAA GGCCTCGAGCAGGG AAAAAAAAAA	ATTGGATCTC/ACATGGGAAG/ACATGGTCAGACATC/ATTCAAATC/AATGGTCAGGCAGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACG	ACCCATTATC ATACATGTGT TTTTCCAGGC. CTGAAAGGACG TTAAAAGATG TTTTTCCATC ATTTTTTCCATC ATTTTTTCCATC ATCTCAGGC 30	PATCCATCAT GCTGGGCTAA AAGAATACTG AAGTGGGTTC AAGTCAAGGG ATTCTGTGCA  40  GCGATATCA GGGGAGAGCA GGGGAGGCC CGGGGAATC 40	CATTGTTATC GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TITTACACTAG GGCCTTAGGA AGTGCTACAC  50  GATCCGAATTI ITTACCCCAGG SAACGCGGGG SATTGAGGTTT  50	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCTTT AGCATCACTAT AGCATCACTAT CCAATATGCC  CAAGCCCTTCC CTCCGCCACTC CGGGGTGTGCC AAACCCGTGAC	CACCCACTGCC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TGAATAAAGCC AGCAAATTTGC TO TO TO TTTTAATCTTA GCAACCATCCC CCAGGTGGTGC GCAATAACTAA TO	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CCTTCTGGAGT TAATCACGATG FAAAACTCAGC  80 AGCAAAAAGAGAC CCTCCTGCCC CGGGCTCTTTC AAAGG	TTTCT CCACC GTAGC CAGGG GTGTG ATGGA AGTGG  90 ACACA AGCAG CCAAA	180 270 360 450 540 630 720 750
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACGTC CTCACCTAGA ATTCCAGGTGAGCT CCACAGGACTGGAA  10 TAGATCTTGGGTACA GGGGTTCAAAAATAA GGCCTCGAGCAGGGA AAAAAAAAAA	ATTGGATCTC/ ACATGGGAAG/ GTCTGTGGCA' TCTTATGTCTC GCCAGACATCC ATTTCAAATCC ATTGGTCAGGT  AGGGTCAGGA AAAATTTCTTT AGGGTGCAGGC GCTTGCGGCCG	ACCCATTATC ATACATGTGT TTTTCCAGGC. CCTGCATGGCI TTGGAACGTG. TTAAAAGATG; TTCATT  30  CAAGGCCATG ATTTTTTCCCTC ATTCCCAGCT CACTCCAGCT 30  30  GGGCGATATCC	PATCCATCAT SCTGGGCTAA AAGAATACTG AAGTGGATCT AAGTCAAGGG ATTCTGTGCA  40  40  GCGATATCG TCCCAAACAT GGGGGGGGGC CCGGGGGAATC 40  40  GGATCCGAAT	CATTGTTATC GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TTTTACACTAG GGCCTTAGGA AGTGCTACAC  50  SATCCGAATTI TTTACACCCAG GAAGGCGGGG GAAGGCGGGGG GATGGAGTTT.  50  TCAAGCCTTGT	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCTTT CACCACCTTT AGCATCACTA TCAATATGCC  60 LAAGCCCTTCC CCGGGGTGTGCC AAACCGCTGAC CAGGACACGTT	CACCCACTGCC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TTCAGACCAGAT TGAATAAAGCT AGCAAATTTGC  TO  CTTTAATCTTA GCAACCATCCC GGAGTGGTGC GCAATAACTAA  70  TGTAAATAAAA	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CCTTCTGGAGT TAATCACGATG CAAAACTCAGC  80 AGCAAAAGAGAG CCGGGCTCTTTC AAAGG 80 ACCACAAAAGAGAACTCAGCC AAAAGCAAAAAGAAACTCAGCCAAAAAAAAAA	TTTCT CCACC GTAGC CAGGG GTGTG ATGGA AGTGG  90 ACACA AGCAG CCAAA	180 270 360 450 540 630 720 750 90 180 270 350
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACCTC CTACACCACCTAGA ATTCCAGCTGAGCT CCACAGGACTGGAA  TAGATCTTGGGTACC GGGGTTCAAAAATA GGCCTCGAGCAGGGA AAAAAAAAAA	ATTGGATCTC/ ACATGGGAAG/ GTCTGTGGCA/ GCCAGACATCC ATTTCAAATCC ATTGGTCAGGCA AGAGTCAGGCA AGAGTCATCTCTTT AGGGTGCAGGC GCTTGCGGCCG  20  GACAAGGCCAT GTAAAAAGCTT GAAAGAACGAC	ACCCATTATC ATACATGTOTI TTTCAGGC. TTTCAGGC. TTGAAAGGTG. TTAAAAGATG. TTATTTTTCCTT ATO ACCCAGGCCAT TTTTTCCCTC ATCTCAGGC.  30 TGGCGATATC TTTTTCCTTC TGCTGAGCTT TTTTTCCTTC TGCTGAGCTT TTTTTCCTT	FATCCATCAT SCTGGGGCTAA AGGATACTG AAGGATGCTGCT AAGGTGGGTTC AAGTCAAGGG ATTCTGTGCA  40 GCGATACTCG TCCCAAACAT GGGGGGGGAT 40 GGGGTCCCAAT CATTATTGCC GGTTCTTAACGG	CATTGTTATC GGTGCTTCAGG GGAGGGATTG TTTACACTAGG AGTGCTACAC  50  SATCCGAATT TTTACCCAG GAAGGCGGGG GATTGACGTT  50  TCAAGCCTTAC  TCAAGCCTTAC TTTACCCCAG TTCAGCCTAC  TCAAGCCTTAC TTCAGCCTTC TTTACCCCAG TTCAGCCTTC TTCAGCCTTC TTCAGCCTTC	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCTTT AGCATCACTAT AGCATCACTAT CCAATATGCC  CAAAGCCCTTCC CCGCGCACTC CGGGGTGTGCC AAACCGCTGAC CAAGACCACTTC CTCGCCCACTC CGGGGTGTGCC CAAACCGCTGAC CCAGACACGTTC CTGGGATTAAATCGTGGATTAAATCGTGGATTACT	CACCCACTGC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TGAATAAAGC AGCAAATTTGC CTTTAATCTTA GCAACACTCCC GCAGTGGTGC GCAATAACTAA TO TTGTAAATAAAA CTCTTGATGCG	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CTATCTGGAGT CTATCTACGATG CAAAACTCAGC  80 AGCAAAAGAG CTTCCTCCCCC CGGGCTCTTTC AAAGG  80 AACACAAATTC AACACAAATTC AACAGGAACTC CACGGCATTTC CACGGCATTTC CACGGCATTTC CACGGCATTTC CACGGCATTTC CACGGCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTT CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTTC CACTGCCATTT CACTGCCATTTC CACTGCCATTC CACTGCCATTT CACTGCCATT CACTGCCATTT CACTGCATT CACTGCCATT CACTGCCATT CACTGCCATTT CACTGCCATTT CACTCATTT CACTCATT CACTGCCATT CACTGCCATT CACTGCCATTT CACTCCATTT CACTGCCATTT	TTTCT CCACC GTAGC CCAGGG GTGTG ATGGA AGTGG AGTGG AGGCACA AGCACA AGCACA AGCACA TCAAT CCATC GACTT	180 270 360 450 540 630 720 750 90 180 270 350
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACGTC CTCACTCACCTAGA ATTCCAGCTGAGCT CCACAGGACTGGAA  10 TAGATCTTGGGTACAG GGGCTTCAAAAATAA GGCCTCGAGCAGGA AAAAAAAAAA	ATTGGATCTC/ ACATGGGAAG/ GTCTGTGGCA' TCTTATGTCTC GCCAGACATCC ATTGCTCAGCT ATTTCAAATCC ATGGTCAGGT GAACAGCGACGA GAACATTCTTT AGGGTGCAGGC GCTTGCGGCCG GTTAAGAAGCCAT GAACAACGAC GAACATAGATG GAACAACGAC GAACATAGATG	ACCCATTATC ATACATETET FITTICCAGGC. CTGAAAGGACG CTAAAAGATG FITTITTCCATC ACCTCGAGCC ACCTCGAGCC ACCTCGAGCC ACCTCGAGCC ACCTCGAGCC TGGCGAAATCC TTGGTAGATT TTGGTAGATT ATATTGACAA	PATCCATCAT GCTGGGCTAA AAGAATACTG AAGTGGGTTC AAGTCAAGGG ATTCTGTGCA  40  GCGATATCG GGGGAGAGG CGGGGGAATC AGATCATGCC GATCATACCT GATCATCCC GTCTTTAAGG AATTGATGCC GTCTTTAAGG AATGAGACT	CATTGTTATC GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TITTACACTAG AGTGCTACAC  50  GATCCGAATTI TITACCCCAG SAACCGGGGG SATTGACTTT  50  TCAAGCCTTG TCAAGCCTTG TCAAGCCTTG TCAAGCCTTG TCAAGCCTTG TCAACCTTC TCACCTCAACTT CCTACCTCAACTT TCACCTCAACTT TCACCTCAACTT TCACCTCAACTT TCACCTCAACTC	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCTTT AGCATCACTAT AGCATCACTAT CCAATATGCC  CAAAGCCCTTCC CTCCGCCACTC CGGGGTTGCC AAACCGCTGAC AAACCGCTGAC CGGGATTACTT CGGGATTACTT CGGGGTTACTT CGGGGTTACTT CGGGGTTACTT CGGGGTTACTT CAGTTCATGG.	CACCCACTGCC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TTGAATCAAGCC AGCAAATTTGC CTTTAATCTTA GCAACTACTCC CCAGCTGGTCC GCAATCACTAA  70  TGTAATAAAAAAC CTCTTTGATGCA GTCTTTTGATGCA ATGATAAGAA	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CCTTCTGGAGT FAATCACGATG SAAAACTCAGC  80 AGCAAAAGAGG CTTCCTGCCC CGGGCTCTTTC AAAGG  80 AGCAAAATTCAGC  CGGCCTCTTTC AAAGG  ACCAGAAATT ACCAGGAAGTC ACCTGCCATTT AACGT ACCAGGAAGTC ACCTGCCATTT ACCTGCCATTT ACCTTTTT ACCATTTTTT ACCATTTTT ACCATTTTT ACCATTTT ACCATTTT ACCATTTT ACCATTT ACCATT ACCAT ACCATT AC	TITCT CCACC GTAGC CAGGG GTOTG ATGGA AGTGG  ACACA AGCACA GCAGC CCAAC  GACTT GTCTA	180 270 360 450 540 630 720 750 90 180 270 350
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACGTC CTCACTCACCTAGA ATTCCAGCTGAGCT CCACAGGACTGGAA  10 TAGATCTTGGGTAC GGGGTTCAAAAATAA GGCCTCGAGCAGGAC AAAAAAAAAA	ATTGGATCTC/ ACATGGGAAG/ GTCTGTGGCA' GTCTGTGGCA' TCTTATGTCTC GCCAGACATCC ATTTCAAATCC ATTGGTCAGGT  AGGGTCAGGCA AAAATTTCTTT AGGGTGCAGGC GCTTGCGGCCG  GACAAGGCCAT TTAAAAAGCTT GAAAGACTAC GAACATAGATC AGGTACTATCCTT	ACCATTATC ATACATGTT TTTTCCAGGC. CTGAAGGTG. TTAAAAGATG. TTTTTTCCATC  30  TTTTTTTCCTC ATCTCCAGCC. ACCTCAGGCC  30  GGGCGATATCC TCGAAGATAT TTGGTAGATAAAAATATTGAAAAACCCCTTGGAAAACCCAGAAAAACCCCTTGGAAACCCCTTGGAAAACCCCTTGGAAACCCCTTGGAAACCCCTTGGAAAACCCCTTGGAAACCCCTTGGAAACCCCTTGGAAAACCCCTTGAAAAACCCCTTGAAAAACCCCTTGAAAAACCACCTTGAAAAACCCCTTGAAAAACCCCTTGAAAAACCCCTTGAAAAACCCCTTGAAAAACCCCTTGAAAAACCCCTTGAAAACCACCTTGAAAACAAAAACCCCTTGAAAAACCACCTTGAAAACCACCTTGAAAACCACCTTGAAAACAAAAACAAAAAAACCCCTTGAAAAACAAAAAAAA	PATCCATCAT CTTGGGCTAA AAGAATACTG AAGTGGGTTC AAGTCAAGGTC ATCTGTGCA  40  TCCCAAACAT GGGGGGGGGATC GGGGGGGGGATC ATTTTGCC AATTCATTGCC AATTCATCGCT AATTATTGCC AATTCACGAATT ATTATTGCC AATTCACGAATACGTGTTCAACGI	CATTGTTATC GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TTTTACACTAG AGTGCTACAC  50  SATCCGAATTI TTTACCCCAGT GAAGGCGGGG GATGGAGTTT .50  TCAAGCCTTATATA TCACACCTATATTA TCACCTCAA ATCTACACTAC AATCTACACTAC AATCTACACTAC AATCTACACTAC CCTACCTCAACTAC CCTACCTCAACTACCTAC	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCTTT AGCATCACTAT AGCATCACTAT CCAATATGCC  60 LAAGCCCTTCC CGGGGTGTGCC AAACCGCTGAC CAGGACACGTT CTAGGTTAAAT TGTTGATAAAT TGGGGGGACTT	CACCCACTGCC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TTCAGACCAGAT TGAATAAAGCC AGCAAATTTGC CTTTAATCTTA CCAGCTGGTGC GCAATAACTAA TGTAAATAAAA CTCTTGAATAAAAA CTCTTGATGAA AATGATAAAGAA GACTTATATAA	CTGTCTAACCC CTCCATGGACT CCTTCTGGAGT CAATCACGATG CAAAACTCAGC  80  AGCTACAAAGGG CCGGGCTCTTTC AAAGG  AACCACAAATT CAGGGAACTC ACCACAATT CAGGGAACTC ACCACATTTT ACCACTTTT ACCACTTTT ACCACTTTT ACCACTTTT ACCACTTTT ACCACTTTT ACCACTTTT ACCATTTT ACCATTTT ACCATTTT ACCACTTT ACCACTT ACCACT ACCAC A	TITCT CCACC GTAGC CAGGG GTGTG ATGGA AGTGG  90 ACACA AGCAG CCAAA  90 TCAAT CCATC GACTT GTCTA GGGAC	180 270 360 450 540 630 720 750 90 180 270 350
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACGTC CTCACTCACCTAGA ATTCCAGCTGAGCT CCACAGGACTGGAA  10 TAGATCTTGGGTACA GGCCTCGAGCAGGGG AAAAAAAAAA	ATTGGATCTC/ ACATGGGAAG/ GTCTGTGGCA' TCTTATGTCTC GCCAGACATC( ATTTCAAATC( ATTGGTCAGGT) AGGGTGCAGGA AAAATTTCTTT AGGGTGCAGGC GCTTGCGGCCG  20  20  GACAAGGCCAT GAACACTTTAAAAAGCTT GAACAAGACCAT GAACATAGATC AGTGTACTACT	ACCCATTATC' ATACATGTGT TTTTCCAGGC. CCTGCATGGC. TTGGAACGGG. TTAAAAGATG. TTCATT  30  CAAGGCCATG TTTTTTCCCTC ATCTCCAGCC  30  CGCGATATCC TTGGAACATATC TTGGTAGAACAA CCCTTGGAAGA CCCATATTATT	PATCCATCAT CTTGGCTAA AGGATACTG AGGTGGGTTC AGGTGGGTTC AGGTCACAC  40  GCGATATCG TCCCAAACAI GGGGGGGGGG 40  GGGTCCGAAT CATTATTGCC GGTCTTAACGI GGTCTAACGI GTGTTAACGI GGTCTAACGI TAACGACTC GGTCTAACGI GGTCTAACGI TAACGACTC GGTCTCAACT TAACACTC TAAC	CATTGTTATC GCTGCTTCAG GAGTGGATTG TTTTACACTAG AGTGCTACAC  50  SATCCCACATT  50  TCAAGCCTTG  50  TCAAGCCTTG  TCAAGCCTTG  TCAAGCCTTG  TCAAGCCTTG  TCAAGCCTTG  TCAAGCCTTG  TCAAGCCTTG  TCAAGCCTTG  TCAAGCCTTG  TATGTTATTA  TCTCACCTAAC  TATGTTATAA  TCTAACTAAAATC  TAGATAAAATC	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCTT CACCACCTTT CACCACCTTT CACCACCTTT TCAATATGCC  60  CAGGCCTTCCC CGGGGTTGCC AAACCGCTGAC TCTCGCCACTT GTAGTTAAAT TTAGTTCATGG, TTGGGGGACTT TACCTTTTTTT	CACCCACTGCC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TTCAGACCAGAT TGAATAAAGCT AGCAAATTTGC  70  TCTTAAATCTTA GCAACATCCC GCAATAACTA  70  TCTTAAATAAAA CTCTTGATGCA GTCTTTTCGGT AATGATAAGAA GACTTATATAAA AGGGTAAGAAC	TGTCTAACCC TCCATGGACT TCTTCTGGAGT TAATCACGATG AAAACTCAGC  80 AGCAAAAGGG CTTCCTGCCC CGGGCTCTTTC AAAGG 80 ATCACAAATT ACAGGGAAGTC ACTGCCATTT ACAGGGAAGTC ACTGCCATTT AGTTGCCCTGT AGTATCACTGTC AGTATCTGTT AGTATCTGT AGTATCT	TITCT CCACC GTAGC CCAGGG GTGTG ATGGA AGTGG  90 ACACA AGCAG CCAAA  90 TCAAT CCATC GACTT GTCTTA GGGAC AATGT	90 180 270 360 450 540 630 720 750 90 180 270 350 90 180 270 360 450 540
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACGTC CTACACCACCTAGA ATTCCAGCTGGAC 10 TAGATCTTGGGTACC GGGGTTCAAAAATAA GGCCTCCAGCAGGGA AAAAAAAAAA	ATTGGATCTC/ ACATGGGAAG/ GTCTGTGGCA/ GTCTGTGGCA/ GCCAGACATCC/ ATTTCAAATCC/ ATTGGTCAGGTCAGGCAGAAAAATTCTTTAAAAGGCCAT GCACAGAGGCAAAAAATTCTTTAAAAGGCCAT GTAAAAAGCTTGAAAAGCTTTGAAAAGCTTTGAAAAGCTTTTTTTGAGTCAGCCACACTAGATCATCCTTTTTTTT	ACCCATTATC ATACATGTOTI TITTCCAGGC. CTGAAAGGACTG. CTAAAAGATG. TTGATT  30  CAAGGCCATG ATTTTTCCCTC ATCTCCAGCC  30  GGCGAATATCG TGGTAGATC TTGGTAGATC ATCTTGGAACCCCATATTTTCTCTAGACCCCCTATTTTCTTTTCTAGACCCCCTTTTTTTT	FATCCATCAT CATGGGGTAA AAGAATACTG AAGGATACTG AAGTCAAGGG ATTCTGTGCA  40  40  GCGATATCGG TCCCAAACAT GGGGGGGGAT CGGGGGGAATCC AGATCATCAG CGGGGGAATCC CGTCTTAACG CGTCTTAACG CATTATTAGC CGTCTTAACG CATTATAGC CATGGAATTTC CATGAATTTC CATGAATTTC CATGAATTTC CATGAATTTC CATGAATTTC CATGAATTTC CATGAATTTC	CATTGTTATC GGTGGTTCAG GGAGGGATTG TITTACACTAG AGTGCTACAC  SO  SATCCGAATT TITTACCCCAG GAAGGCGGGG GATTGAGCTT  TCAGCCTTG TCAGCCTTAT GTTCAGCCTT CCTACCTCAA TAGATAAATC TAGATAAATC TAGATAAAATC	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCTTT AGCATCACTAT AGCATCACTAT AGCATCACTAT CCAAGCCCTTCC CCAGCCCTTCC CCGCGCACTC CCGCGCACTCC CCGCGCTGAC AAACCCCTTGC CTCGCCACTCC CTCCTTCTCACTCC CTCTTTCCACTCC CCACCTTTTTCCTTTTCCACTCC CCACCTTTTTCCACTCC CCACCTTTTTCCACTCC CCACCTTTTTCCTTTTCCACTCC CCACCTTTTTCCACTCC CCACCTTTTCCACTCC CCACCTTTTCCACTCC CCACCTTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACCTC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACCTC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACCTC CCACCTTCC CCACCTTTCCACCTC CCACCTTCCACTCC CCACCTTCC CCA	CACCCACTGCC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TTGAATAAAGCC AGCAAAATTTGC CTTTAATCTTA GCAACCACTCC CGAGCTGGTGC GCAATAACTAA TTGTAAATAAAA CTCTTGATAAAAAAAC CTCTTGATACTTAGCACTTTTCGGT AATGATAACAA ACAGTAAGAA ACAGTAAGAAC ACGTAGCAGAGA	TGTCTAACCC TCCATGGACT TCTTCTGGAGT TCTTCTGGAGT TAATCACGATG FAGAAACTCAGC  80  AGCAAAAGAG CTTCCTGCCCC CGGGCTCTTTC AAAGG  80  ACCACAAATT ACAGGGAACTC TACTGGCATT ACAGTTTCTTTTTCTTTTC	TTTCT CCACC GTAGC CCAGGG GTGTG ATGGA AGTGG  AGCACA AGCACA GCCAAA  90 TCAAT TCAAT CCATC GACTT GTCTA GGACC AATGT AACAA	90 180 270 360 450 540 630 720 750 90 180 270 350 90 180 270 360 450 450 540 630
ACCCTCCTTTACAA CCGCCAGGCTCTCT ATCAAACCCACGTC CTCACTCACCTAGA ATTCCAGCTGAGCT CCACAGGACTGGAA  10 TAGATCTTGGGTACA GGCCTCGAGCAGGGG AAAAAAAAAA	ATTGGATCTC/ACATGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	ACCCATTATC ATACATETOT TTTTCCAGGC CTGAAAGGTG TTGAAAAGATG TTTTTTCCATC ACCCAGGC ACCCAGGC ACCCAGGC ACCCAGGCC ACCCAGGCC ACCCCAGGCC ACCCCAGGCC ACCCCAGGCC ACCCCAGGCC ACCCCAGGCC ACCCCAGGCC ACCCCAGGCCC ACCCCAGGCCCCCTAGTCCCCCTCCAGCCCCCCCCCC	FATCCATCAT CATGGGGTAA AAGAATACTG AAGGATACTG AAGTCAAGGG ATTCTGTGCA  40  40  GCGATATCGG TCCCAAACAT GGGGGGGGAT CGGGGGGAATCC AGATCATCAG CGGGGGAATCC CGTCTTAACG CGTCTTAACG CATTATTAGC CGTCTTAACG CATTATAGC CATGGAATTTC CATGAATTTC CATGAATTTC CATGAATTTC CATGAATTTC CATGAATTTC CATGAATTTC CATGAATTTC	CATTGTTATC GGTGGTTCAG GGAGGGATTG TITTACACTAG AGTGCTACAC  SO  SATCCGAATT TITTACCCCAG GAAGGCGGGG GATTGAGCTT  TCAGCCTTG TCAGCCTTAT GTTCAGCCTT CCTACCTCAA TAGATAAATC TAGATAAATC TAGATAAAATC	TATCCCCCAT TCGTGTCCTG CCATGCCTTT AGCATCACTAT AGCATCACTAT AGCATCACTAT CCAAGCCCTTCC CCAGCCCTTCC CCGCGCACTC CCGCGCACTCC CCGCGCTGAC AAACCCCTTGC CTCGCCACTCC CTCCTTCTCACTCC CTCTTTCCACTCC CCACCTTTTTCCTTTTCCACTCC CCACCTTTTTCCACTCC CCACCTTTTTCCACTCC CCACCTTTTTCCTTTTCCACTCC CCACCTTTTTCCACTCC CCACCTTTTCCACTCC CCACCTTTTCCACTCC CCACCTTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACCTC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACCTC CCACCTTTCCACTCC CCACCTTTCCACCTC CCACCTTCC CCACCTTTCCACCTC CCACCTTCCACTCC CCACCTTCC CCA	CACCCACTGCC CCCTTTGCGAC TTCCAGGGGAT TTGAATAAAGCC AGCAAAATTTGC CTTTAATCTTA GCAACCACTCC CGAGCTGGTGC GCAATAACTAA TTGTAAATAAAA CTCTTGATAAAAAAAC CTCTTGATACTTAGCACTTTTCGGT AATGATAACAA ACAGTAAGAA ACAGTAAGAAC ACGTAGCAGAGA	TGTCTAACCC TCCATGGACT TCTTCTGGAGT TCTTCTGGAGT TAATCACGATG FAGAAACTCAGC  80  AGCAAAAGAG CTTCCTGCCCC CGGGCTCTTTC AAAGG  80  ACCACAAATT ACAGGGAACTC TACTGGCATT ACAGTTTCTTTTTCTTTTC	TTTCT CCACC GTAGC CCAGGG GTGTG ATGGA AGTGG  AGCACA AGCACA GCCAAA  90 TCAAT TCAAT CCATC GACTT GTCTA GGACC AATGT AACAA	90 180 270 360 450 540 630 720 750 90 180 270 350 90 180 270 360 450 540

图 2 AP1~AP6 的核苷酸序列

Fig. 2 The DNA sequences of AP1 ~ AP6

#### 23 序列结果分析

将获得的序列用 Blast 软件分析并与 Gene Bank 数据库中的已知基因进行同源性比较。分析结果表明,这 11 个基因片段是梅花鹿生茸区骨膜中的新基因,虽然它们在其它哺乳动物组织中已经得到了研究。其中 5 个基因片段(APU1、APU2、APU3、APU4、APU5)同其它哺乳动物常见基因组基因具有较高的同源性,在另外 6 个基因片段(AP1、AP2、AP3、AP4、

AP5、AP6)中,有些同其它哺乳动物中有关的免疫学、肿瘤生物学基因片段具有较高的同源性;有些同已知基因的同源性不是很高,因此不能排除是目前尚未知的新基因,为研究鹿茸再生的候选基因。

#### 3 讨论

本实验在亚克隆过程中使用了 E. coli BM 25.8 菌, 此宿主菌表达 P1 cre 重组酶, 该重组酶识别并切割噬菌体的 loxP 位点从而形成完整的质粒, 即通过

此位点专一性重组质粒的亚克隆<sup>18</sup>。由 cre 重组酶产生的质粒为质粒多聚体的混合物,故直接从 E. coli BM 25.8 中小量提取的质粒是不能用于凝胶电泳分析和测序的,所以将亚克隆质粒转化到宿主菌 DH  $5\alpha$  后,再提取质粒进行 PCR、测序分析等。

本实验测了 11 个序列, 将获得的序列用 Blast 软件分析并与Gene Bank 数据库中的已知基因进行 同源性比较,其中基因片段 AP1 同牛泛素特异性肽 酶 34 基因具有很高的同源性, 同源性为 99 %。如果 能够在梅花鹿生茸区骨膜中对该基因进行定位,进 一步纯化表达该基因的细胞,并对这些细胞进行培 养,通过有效物质的诱导,追踪其在细胞中的信号传 导途径,将有可能揭示其调控系统;基因片段 AP2 同人的血栓调节蛋白基因高度同源(80%),基因片 段 AP2 在鹿茸组织快速有序而没有检测到癌变发 生的生长过程中是否起到了调节作用有待进一步研 究: 基因片段 AP3 同牛的 T 细胞表面受体基因高度 同源,同源性为 79%,在鹿生茸区骨膜可能同机体 免疫有关: 基因片段 AP4 同朊病毒前蛋白具有同源 性(61%),但是它在生茸区骨膜细胞中的作用不清 楚: 基因片段 AP5 同猪类胰岛素生长因子结合蛋白— 2 高度同源(75%)。如果能够通过基因片段AP5 的序 列设计引物,对其表达量进行测定,有可能为揭示鹿 茸组织有序快速生长,但检测不到癌变发生的现象提 供线索: 基因片段 AP6 类似人 NFKB(核转录因子 KB) 基因片段, 同源性为 71%, 进一步地研究将揭示 NFKB 是否也在鹿角的脱落过程中起到了凋亡作用。

通过本研究将进一步确认梅花鹿生茸区骨膜在 分子水平上也是一种特殊的组织。在测序的 11 个 EST 片段中, 虽然有些与哺乳动物组织中已知基因的同源性较高, 但有些较低。进一步地研究将确定这些同源性较低的基因是由于种属之间的差异所致, 还是它们本身就是从未发现的新基因。如果是后一种情况的话, 则认为梅花鹿生茸区骨膜将是一种开发新基因的难得的组织。因此, 该组织将在分子生物学研究领域至关重要。

究.

# 参考文献

- [1] 赵海平. 青海血蜱幼蜱 cDNA 表达文库的构建及其保护性抗原基因的免疫学筛选[1]. 中国兽医科学, 2007, 37 (6): 461-464.
- [2] 岳占碰, 邓旭明, 冯海华. 鹿茸角发育与再生机理[J]. 经济动物学报, 2005, 9(1): 46-49.
- [3] 林俊堂, 李玉昌, 张会勇, 等. 常氏肝癌细胞 cDNA 文库的构建及 ADAMs 相关基因的免疫筛选与序列分析[J]. 遗传, 2004, 26(6): 793—796.
- [4] 鲁晓萍. 梅花鹿生茸区骨膜干细胞 cDNA 表达文库的构建[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009, 115(3): 115—117.
- [5] Goss RJ, Powel RS. Induction of Deer Antlers by Transplanted Periosteum I. Graft Size and Shape JJ. Exp Zool, 1985, 235: 359 — 373.
- [6] Li C, Suttie JM. Deer Antlerogenic Periosteum: a Piece of Postnatally Retained Embryonic Tissue [J]. Anat Embryol, 2001, 204; 375—388.
- [7] Li C, Yang F, Li G, et al. Antler Regeneration: a Dependent Process of stem tissue primed via interaction with its enveloping skin [J]. Exp Zool. 2007, 307A; 95—105.
- [8] Shen Yangmei, Liu Shuyun Zhao Xia. Construct of cDNA Expression Library of Human Decidua and Immunoscreen of Serum [J]. West China Medical, 2005, 20(3): 456—457.